

Previous Doc

Next Doc

Go to Doc#

First Hit



Generate Collection

L4: Entry 46 of 51

File: DWPI

Jul 29, 1997

DERWENT-ACC-NO: 1997-429190

DERWENT-WEEK: 199740

COPYRIGHT 2005 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Anti HIV agents, having sufficiently high anti-HIV activity even in very low concentration comprises active ingredient extracted from Fuscoporia obliqua Fr. Aoshima, having low cytotoxicity and activating lymphocytes

AGENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

SAKUMA K

CODE

SAKUI

PRIORITY-DATA: 1996JP-0023208 (January 16, 1996)

Search Selected

Search ALL

Clear

AGENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

☐ JP 09191891 A

July 29, 1997

009

C12P001/02

APPLICATION-DATA:

PUB-NO

APPL-DATE

APPL-NO

DESCRIPTOR

P 09191891A

January 16, 1996

1996JP-0023208

WT-CL (IPC): A61 K 35/84; C12 P 1/02; C12 P 1/02; C12 R 1:645

EXTRACTED-PUB-NO: JP 09191891A

SIC-ABSTRACT:

anti-HIV agent comprises the active ingredient which is extracted from Fuscoporia obliqua Fr. Aoshima has high action of inhibiting formation of giant cell by HIV and preventing infection in a concentration of 35 nano-grams/ml. Preferably the ingredient is extracted from the black part of the fungus or a cultured product of the fungus. Preferably the cultured product is a sawdust or a liquid cultured product. Preferably for the liquid cultured product, a heat-dried product of the fungus is used as the active ingredient. Also claimed is an anti-HIV agent comprising the active ingredient extracted from the fungus and exerting the action in a concentration of 350 nano-grams/ml. Also claimed is an anti-HIV agent comprising the active ingredient extracted from the fungus and exerting the action in a concentration of 3500 nano-grams/ml. Also claimed is an anti-HIV agent comprising the active ingredient extracted from the fungus and exerting the action at a level of 0.01 micro-g/ml or higher. Preferably the level of the active ingredient is 0.1 micro-gram/ml or higher, more preferably 1 micro-g/ml or higher and most preferably 10 micro-g/ml. Also claimed is an anti-HIV agent containing the active agent obtained by treating the cultured product of the (natural) fungus with PBS, butanol, ethyl acetate and/or acetone and collecting from the insoluble. Also claimed is an anti-HIV agent containing the active agent obtained by subjecting the cultured product of the (natural) fungus to adsorption with carbon or charcoal and collecting the unadsorbed.

ADVANTAGE - The agents have very good inhibition of HIV in a very low concentration and very low cytotoxicity and activate lymphocytes effectively.

ATTACHED-DRAWING: Dwg.0/10

TITLE-TERMS: ANTI HIV AGENT SUFFICIENT HIGH ACTIVE EVEN LOW CONCENTRATE COMPRISE ACTIVE INGREDIENT
EXTRACT LOW CYTOSTATIC ACTIVATE LYMPHOCYTE

DERWENT-CLASS: B04 D16

EPI-CODES: B04-F09; B14-A02B1; D05-C; D05-H13;

CHEMICAL-CODES:

hemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M423 M781 M903 P210 V500 V550

SECONDARY-ACC-NO:

PI Secondary Accession Numbers: C1997-137218

[Previous Doc](#)

[Next Doc](#)

[Go to Doc#](#)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-191891

(43)公開日 平成9年(1997)7月29日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 1/02			C 1 2 P 1/02	B
A 6 1 K 35/84	ABD		A 6 1 K 35/84	ABDA
	ADY			ADY
// (C 1 2 P 1/02				
C 1 2 R 1:645)				

審査請求 未請求 請求項の数18 F D (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平8-23208

(22)出願日 平成8年(1996)1月16日

(71)出願人 592142496

佐久間 和夫

北海道上川郡下川町上名寄2119の1

(72)発明者 本多 三男

東京都三鷹市下連雀2-5-11

(72)発明者 佐久間 和夫

北海道上川郡下川町上名寄2119の1

(72)発明者 江村 達男

札幌市豊平区豊平3条4丁目1-15

(72)発明者 山崎 修道

東京都東大和市狭山3-1204-3

(54)【発明の名称】 抗HIV剤

(57)【要約】

〔目的〕非常に低濃度のレベルでもHIVに対し十分高い活性度を有するキノコ由来、特にカバノアナタケ由来の強力な抗HIV剤を実現すること。

〔構成〕カバノアナタケの天然物又は培養物から抽出した活性成分を35ナノグラム/ml又はそれ以上の超微量で含有する抗HIV剤。〔作用〕この超微量のレベルでED50値が達成される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 35ナノグラム／mlの濃度でHIVによる巨大細胞形成に対する強い抑制作用および感染阻止作用をもつカバノアナタケより抽出した活性成分より成る抗HIV剤。

【請求項2】 350ナノグラム／mlの濃度でHIVによる巨大細胞形成に対する強い抑制作用および感染阻止作用をもつカバノアナタケより抽出した活性成分より成る抗HIV剤。

【請求項3】 3500ナノグラム／mlの濃度でHIVによる巨大細胞形成に対する強い抑制作用および感染阻止作用をもつカバノアナタケより抽出した活性成分より成る抗HIV剤。

【請求項4】 0.01 μ g／ml以上のレベルの濃度でHIVによる巨大細胞形成に対する強い抑制作用および感染阻止作用をもつカバノアナタケより抽出した活性成分より成る抗HIV剤。

【請求項5】 前記活性成分はカバノアナタケの黒色部分より抽出されたものである請求項1または請求項4に記載の抗HIV剤。

【請求項6】 前記活性成分はカバノアナタケ培養物より抽出されたものである請求項1または請求項4に記載の抗HIV剤。

【請求項7】 前記培養物はオガクズ培養によるものである請求項6に記載の抗HIV剤。

【請求項8】 前記培養物は液体培養による請求項6に記載の抗HIV剤。

【請求項9】 前記液体培養された菌糸を加熱乾燥したものを活性成分とする請求項8に記載の抗HIV剤。

【請求項10】 前記活性成分の濃度が0.1 μ g／ml以上のレベルである請求項4に記載の抗HIV剤。

【請求項11】 前記活性成分の濃度が1 μ g／ml以上のレベルである請求項4に記載の抗HIV剤。

【請求項12】 前記活性成分の濃度が10 μ g／ml以上のレベルである請求項4に記載の抗HIV剤。

【請求項13】 天然カバノアナタケまたはカバノアナタケ培養物を、PBS、ブタノール、酢酸エチル、またはアセトン処理し、その各不溶物より取り出した活性成分を有する抗HIV剤。

【請求項14】 天然カバノアナタケまたはカバノアナタケ培養物を、カーボンまたはチャコールで吸着処理し、その各非吸着物より取り出した活性成分を有する抗HIV剤。

【請求項15】 請求項1ないし4、または請求項13ないし14いずれかの活性成分を、紫根、桂皮または桃仁のいずれかまたは全部と併用する抗HIV剤。

【請求項16】 請求項1ないし4、または請求項13ないし14いずれかの活性成分を、コーヒー、茶、ビール、牛乳などの飲料またはパン、ハンバーガーなどの食品等に混ぜて、健康食品または健康飲料的に用いるよう

にした抗HIV剤。

【請求項17】 請求項1ないし4、または請求項13ないし14いずれかの活性成分と、紫根、桂皮または桃仁のいずれかまたは全部とを、コーヒー、茶、ビール、牛乳などの飲料またはパン、ハンバーガーなどの食品等に混ぜて、健康食品または健康飲料的に用いるようにした抗HIV剤。

【請求項18】 健全哺乳動物またはHIV感染哺乳動物（ヒトを含む）から採取したリンパ球を適正な培養条件下で請求項1ないし4、または請求項13または14いずれかの活性成分と接触させることにより、健全リンパ球を活性化させ、かつ存在するHIV感染リンパ球を死滅させる用途に使用される抗HIV剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】本発明は、エイズウィルス（HIV）による巨大細胞形成と感染とを抑制し、または阻止する強力な活性を有する抗HIV剤に関するものである。より具体的に、本発明は担子菌類の中でも特にHIVに対し他に例を見ない微量で強力な抑制作用をもつカバノアナタケの抽出物を活性成分とする抗HIV剤に関するものである。

【0002】

【発明の背景】エイズウィルス（HIV）抑制剤として、最近AZT、DDIおよびその他の化学製剤が知られている。しかし、これら化学製剤は人体への副作用やHIVの耐性獲得などの問題があるので、これを避けるためキノコの抽出物を抗HIV剤として使用する試みがなされている。例えば公知例（1）として、特開昭63-316734があり、これは「抗ウイルス剤」として担子菌類から抽出される多糖体または蛋白多糖体を有効成分とするものを記載しているが、担子菌類の具体例としてはマンネンタケ、エノキタケ、キクラゲの3種を実験しているにとどまる。また、公知例（2）として特開平2-134325があり、これはエイズ治療剤およびその製造方法という発明の名称で、担子菌の菌糸体培養物から抽出された成分からなるエイズ治療剤を示している。公知例（2）の担子菌の採用可能な範囲としては椎茸、カワラ茸、ヒラ茸、エノキ茸、マンネン茸、マイ茸が列記されているが、具体的な実施例としては椎茸だけに限られている。

【0003】これら公知例を見ると、公知例（1）ではマンネンタケ、エノキタケ、キクラゲからの抽出物の凍結乾燥品10mgを100mlの蒸留水に溶解し、いずれも1mg/mlの濃度で使用しており、また公知例（2）では椎茸の抽出液を凍結乾燥した褐色粉末を0.1、0.25、0.5mg/mlの濃度で実験しているが、実際に巨大細胞形成阻止効果が認められるのは、0.5mg/mlという比較的高濃度においてである。このことは、要するに、椎茸やマンネンタケ、エノキタケ、キクラゲ等の日

常に知られているキノコの菌糸体からの抽出物では抗HIV効果はあることはあっても、活性度が十分高くないということの意味するものであって、その証拠に公知例(2)の臨床試験(実施例1の(9)エイズ患者に対する臨床試験)のケース1では、T4細胞1250個/mm³の患者が細胞数2542個に回復したとしているが、重症のエイズ患者であればT4細胞数はもっと低い(例えば300個/mm³)のが普通であって、1250個も細胞数がある患者を治療させたというだけでは、逆に有効成分(椎茸)の抗HIV活性度が低いという結論になる。事実、同公開公報のケース2では細胞数822個の患者が椎茸成分を経口投与したにもかかわらず肺炎を併発して死亡している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】これらの背景を考慮して、本発明は、従来の技術水準では達成できなかった非常に低濃度のレベルでもHIVに対し十分高い活性度を有するキノコ由来、特にカバノアナタケ由来の強力な抗HIV剤を実現することを課題としている。本発明においてカバノアナタケは天然産物も培養物も同等に有効である。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、キノコの中でも特にカバノアナタケの菌糸の抽出物を有効成分としてエイズウイルスによる巨大細胞形成に対する抑制と感染阻止の作用を有する抗HIV剤を提供する。カバノアナタケは、真菌類の中の担子菌亜門、帽菌亜綱、ヒダナシタケ目、タバコウロコタケ科、サビアナタケ属、カバノアナタケ種〔学名 *Fuscoporia obliqua* (Fr.) Aoshima〕と分類されているもので、天然にはシラカバ、ダケカンバなどのようなカバノキ類の立木の幹に生育して、石炭の集塊のような黒色の菌核を形成する。菌核は径20cmにもなることがあり、元来はシラカバなどのカバノキ類にとって有害な菌(いわば癌)として知られていた。しかしながら本発明者の一人(佐久間 和夫)は、このカバノアナタケ(俗称チャガ)が強い生命力をもつことに着目して研究し、その菌糸の抽出物がエイズウイルスの増殖を抑制する効果のあることを見出して先に特許出願(特願平5-159946)をしている。これを基に本発明者らは共同して研究を重ね、チャガ抽出液の抗HIV効果について解析し、天然チャガについてはもちろん、チャガ菌糸の培養法により得た抽出液中にも天然チャガで認められるような強い抗HIV効果を示すことを明らかにしたのである。

【0006】天然チャガ抽出液の抗HIV効果は、菌核の表面の黒色部分由来のものは、その内側の非黒色(褐色)部分より一段と強く、Molt4感染細胞を用いたHIV感染によるFusion(細胞融合、これにより巨大細胞形成が起こる)は、35ng(ナノグラム)でも阻止されることが認められた。また、一定条件下での

大量培養を目的として、オガクズ培養法により得られた抽出液を同方法にて解析した結果、天然チャガ抽出液の60~70%の抗HIV効果が認められた。さらに、液体培養法により得られた菌糸の加熱乾燥物、および培養ろ液を正常人末梢血単核細胞のPHA刺激細胞を用いたHIV-BRU(100TCID₅₀)の感染系を用いて解析した結果、菌糸の加熱乾燥物は効果的に抗HIV効果があることが明らかになった。上記天然物の巨大細胞抑制におけるED₅₀は35ng/ml(0.01μl/ml相当)であった。これらの事実は、先に挙げた2件の公知例記載のキノコでは達成され得ない非常に低濃度のレベルでチャガに抗HIV活性があることを示すもので、有効成分の単離されていない状態での活性力であるから驚異的である。また本発明はこのようなチャガ抽出物に、漢方薬成分を併用することにより、抗HIV剤の作用を相乗的に高め得ることを見出し、確立した。

【0007】本発明は、いわゆるエイズウイルスの増殖といわれる中の2つの形態、すなわち巨大細胞形成と、感染とに関して、カバノアナタケの天然産物、オガクズ培養物の抽出物、液体培養菌糸の加熱乾燥物、培養生菌、培養ろ液を使用して抗HIV活性に関する検討を行ったので、以下これについて詳細に説明する。

- 試験試料 1. カバノアナタケ黒色部分(天然)
2. カバノアナタケ培養抽出物(オガクズ培養)
3. カバノアナタケ培養菌糸の加熱乾燥物(液体培養)
4. カバノアナタケ培養生菌(液体培養)
5. カバノアナタケ培養ろ液(液体培養)

(1) 巨大細胞形成抑制試験(Fusion Assay)(図1)
Molt4/c18細胞(非感染細胞)とMolt4/HIV IIIB細胞(感染細胞)を1:1の割合で共培養(coculture)すると、感染細胞の周りに非感染細胞が接着し融合して巨大細胞形成が起こる。これはエイズ増殖の1形態である。この共培養系にカバノアナタケ黒色部分(天然)(試料1)とカバノアナタケ培養抽出物(オガクズ培養)(試料2)を添加すると巨大細胞形成抑制効果が認められた。試験方法: 96穴マイクロプレートの各穴にMolt4/c18細胞(1×10⁶) + Molt4/HIV IIIB細胞(1×10⁶)と上記試料1及び試料2を各々100, 10, 1, 0.1μl/mlずつ添加し、24時間培養した後、マルチサイザーにて細胞の直径を測定した。直径20μm以上のものを巨大細胞とみなし、その出現率を比較検討した。結果は図1のグラフに示す。このグラフにおいて、縦軸は対照に対する巨大細胞形成の抑制率(%)で、横軸は試料の濃度(μl/ml)である。カバノアナタケ黒色部分は、AZTに対し倍以上の抑制率を示している。またカバノアナタケ培養抽出物も濃度10μl/ml以上ではAZTに優る抑制率を示している。さらに、図1のグラフにおいて、本発明のカバノアナタケ黒色部分(天然物)が濃度0.01μl/ml(35ナノグラム/mlに相当)においてED₅₀を達成していることは驚異的である。

【0008】(2) 感染阻止試験 (Neutralization Assay) (図2)

エイズウイルス増殖の他の形態として、ウイルスが1つの細胞から飛び出して健全な細胞に入り込む、いわゆる感染がある。本発明の活性成分がこの感染を阻止するかについて、上記試験試料1~5を使用してその効果を検討した。試験方法: PHA-blast (PHA(フィトヘムアグルチニン)で刺激した健常人の末梢血単核細胞(PBMC)) (3×10^6) と試料1~5を100, 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度で37℃において1時間前処理したのち、HIV-BRU(0.03cpm/cell) を添加し24時間培養し、洗浄後、さらに5日間培養した。細胞生存数(viability)を確認した上で、HIV抗原(P24 antigen)をELISA法にて測定し、感染阻止能を比較検討した。結果は図2のグラフに示す。このグラフの縦軸は感染阻止率%で、横軸は試料の濃度 $\mu\text{l}/\text{ml}$ である。カバノアナタケ黒色部分(天然)の抽出物(黒丸)は高い阻止率を示し、特に濃度1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (3500ナノグラム/ ml) 以上では70%から90%に達する阻止率を示している。培養抽出物(白丸)はオガクズ培養したものである。培養菌糸加熱乾燥物(黒四角)、培養生菌(白三角)、培養ろ液(黒三角)はいずれも液体培養により得られた菌糸で、加熱乾燥物とは、菌糸を105℃で加熱乾燥したもの(他の乾燥法より香ばしい香りがする)、培養生菌は液体培養した菌糸を熱水で煮たのち凍結乾燥したものである。加熱乾燥物(黒四角)は0.1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度で比較的高い阻止率を示している。

【0009】次に、本発明のチャガが細胞生存数(viability)にどのように影響するかについて検討した。この検討の結果は図3の2つのグラフに示してある。HIV(-)のグラフは非感染系、HIV(+)は感染系についての結果である。グラフの縦軸は生存%、横軸は試験日数である。この試験においてはチャガ抽出物を0, 3.5, 35, 350, 3500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度で用いたが、3500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では感染系、非感染系を問わず、生細胞数は非常に少なくなっていた。チャガ抽出物の同じ各濃度でのHIV抗原(P24)の産生量を図4のグラフ(縦軸はHIV抗原P24の産生濃度(pg/ml)、横軸は日数)に示すが、HIV抗原P24の産生量が低いのは、チャガの直接的な抗HIV作用によるものではなく、感染あるいは非感染細胞が死滅したためである。図3のグラフに戻って、チャガ350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度(黒四角)においては生細胞数は対照に比べて減少してきているものの、感染系、非感染系で生細胞数に大きな差が認められた。すなわち、感染系では経時的に下降する傾向が見られるが、非感染系では4日目以降回復を見せた。このことは、チャガ350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では感染細胞を特異的に殺している可能性があること、または非感染系において食細胞の活性化に寄与している可能性などが推測される。チャガ35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においては、生

細胞数は対照と大差なくviabilityも対照と同じような動向を示し、また図4のグラフに示すようにHIV抗原P24の産生を良好に抑制していた。これはチャガの抗HIV作用によるものと考えられた。

【0010】次に、本発明はチャガがウイルスに直接作用することにより抗HIV作用を示すのかどうかを探るための試験を行った。この試験の結果は図5のグラフAとグラフBに示すが、まずチャガとウイルスを2時間、前処理したのち、45000rpmで90分間超遠心し、チャガを除去した。そのウイルスをPHA(フィトヘムアグルチニン)で刺激したPBMC(末梢血単核細胞)に感染させた。結果はグラフA(縦軸はP24抗原の濃度 pg/ml 、横軸は濃度)に示すとおりで、対照のウイルスとほぼ同様の感染性が認められた。つまり、チャガの抗HIV作用は、直接的にウイルスに作用していないと考えられた。つぎに、チャガとPHAで刺激したPBMCを2時間、前処理したのちウイルスを感染させた。結果はグラフBに示すとおりであって、先程、比較的にviabilityが保たれていた濃度において濃度依存的に感染を阻止することが明らかになった。

【0011】さらに、PHAで刺激したPBMCをチャガで24時間前処理した場合と、1時間前処理した場合、前処理を行わない場合の感染阻止を調べた。結果は図6のグラフに示すとおりで、グラフA(縦軸は阻止率%、横軸はチャガによる標的細胞の前処理時間)の方法はそれぞれ前処理を行ったのち、100TCID₅₀のHIVウイルスをチャガ存在下で感染させ、洗浄後、チャガを含む培養液で培養し、5日目に放出されるHIV抗原P24を測定した。この結果、1時間前処理でも24時間前処理した場合と同様に70%以上の活性を示した。さらに、前処理を行わない場合においても、感染を50%抑制することが明らかになった。図6のグラフBは、1時間前処理したPBMCを同じ方法で感染させたのち、さらに、感染後、1日目、2日目、3日目にチャガを添加する場合の感染阻止を調べた結果を示すものである。この結果、チャガを添加する時期が遅いと若干感染阻止は低下するものの、チャガを含まない培養液で培養した場合でも感染を60%抑制することが明らかになった。以上のことから、本発明のチャガ活性成分は感染が成立する際に抗HIV効果を発揮するのではないかと考えられる。また、前処理した場合の方がより感染を阻止することが明らかになった。こうして、チャガが細胞側に何らかの作用をしているだろうとの推測が成り立つ。

【0012】図7はMolt4/c18細胞(非感染細胞)をMolt4/HIV IIIB細胞(感染細胞)と共培養したときの巨大細胞形成に対する本発明の抗HIV剤の抑制効果を示すグラフである。この結果、チャガは巨大細胞の形成を濃度依存的に抑制することが明らかになった。チャガはHIV感染の際のエントリー(entry)に深く関与していると考えられた。

【0013】次に図9(巨大細胞形成阻止作用)を参照すると、本発明は、チャガの抗HIV活性因子の大量生産を目的として、さまざまな培養条件でチャガの培養を試みた結果、培養によっても天然のチャガ様菌体を得られる培養条件を確立した。その中でも、特にオガクズ培養(白丸)と液体培養(黒四角)で得られた抽出液と、ろ液(白三角)を用いて、巨大細胞の形成阻止能を測定した。図9にはこの結果を天然チャガ黒色部分の例(黒丸)と共に示す。図9は、Molt4/c18細胞(非感染細胞)をMolt4/HIV IIIB(感染細胞)と共培養したときの巨大細胞形成(Syn-cytium Formation)に対する本発明の種々の抗HIV剤の阻止能を調べた結果のグラフである。縦軸は阻止率%、横軸は抗HIV剤の濃度である。この結果5種類(チャガ黒色部分、オガクズ培養、液体培養加熱乾燥物、ろ液、培養菌糸)の抗HIV剤とも巨大細胞の形成を濃度依存的に抑制し、天然物(黒丸)では超微量の35ナノグラム/ml(0.001 μ g/ml)付近ですでにED50を達成し、濃度と共に抑制率が飛躍的に高くなっている。また、培養で得られた抽出液でも50%またはそれ以上巨大細胞の形成を阻止することが明らかにになった。さらに、ろ液(白三角)においても40%の抑制効果があることが明らかにになった。

【0014】本発明のチャガは天然産のほか、オガクズ培養物、液体培養物もそれぞれに抗HIV作用を有することは前述したが、これをさらに詳細に示すため図8に感染阻止実験のグラフを示す(縦軸は阻止率%、横軸は抗HIV剤の濃度)。巨大細胞形成抑制実験で用いたサンプルで、図8に示すように5種類の抗HIV剤の種々の濃度での感染阻止実験を行った。その結果、巨大細胞形成阻止能と相関して感染阻止活性があることが認められた。天然物のチャガ(黒丸)には及ばないものの、培養で得られた抽出液でも相当な感染阻止活性が認められた。特に、チャガ黒色部分は従来予想されなかった低濃度、例えば、大体0.01 μ g/ml前後の濃度でも約50%の阻止率を挙げている。これは、前記した公知例の椎茸やエノキタケ、マンネンタケ等の活性濃度よりはるかに低い濃度でより高い活性を有することを示している。

【0015】本発明に係るカバノアナタケより抽出した活性成分は、きわめて有効な抗HIV剤であることが認められたが、実用的にはこれら活性成分を漢方薬系の薬用成分と併用するとさらに有効性が高まることが認められる。例えば、紫根、桂皮、桃仁、半夏(はんげ)、ブクリョウ、ブシ(加工)人參葉、甘草、五味子、カンキョウ(しょうが)、細苦、杏仁、大黃などのような漢方薬成分を本発明のカバノアナタケ活性成分と併用もしくは混用することが可能であり、特に紫根、桂皮、桃仁の3種類をカバノアナタケ抽出活性成分と混用することがHIV抑制に实际的に有利であることが認められる。HIVは、それが潜在している人体細胞に他の細菌性ウィルスが感染するとそれ自身活発化して増殖を開始し、エ

イズを発症させることになる」と知られている。このような混合感染によるHIVの活発化を抑えるには、特に紫根、桂皮、桃仁などの漢方薬系成分を1種またはそれ以上カバノアナタケ活性成分と併用または混合服用することにより、服用者の肝臓、腎臓などの臓器を細菌性ウィルスから守り浄化し強健にしてエイズの発症を抑制することができ、それによりカバノアナタケ活性成分の本来の有効性をよりよく発揮させることができる効果がある。

10 【0016】本発明に係るカバノアナタケ活性成分は、実際問題として、種々な溶媒又は抽出手段によって抽出することができる。例えば、天然カバノアナタケまたは培養カバノアナタケの菌糸をPBS溶液、ブタノール、酢酸エチルまたはアセトンにより処理し、その各不溶物から活性成分を取り出すことができる。あるいは、天然カバノアナタケまたは培養カバノアナタケの菌糸成分または菌糸抽出物をカーボンまたはチャコールで吸着処理し、その各非吸着物から活性成分を取り出すこともできる。また、天然カバノアナタケまたは培養カバノアナタケを種々なpHの水で煮沸(例えば60分間煮沸)することによっても有効成分を抽出することができる。本発明によるこれら抽出活性成分は、水溶性で耐熱性、耐酸性ある安定な物質であると認められ、いずれもほぼ等しくHIVの巨大細胞形成阻止能と感染阻止能を示すことが認められた。なお、本発明でいうカバノアナタケとしては、上記したようなオガクズ培養および液体培養による培養のほか、人工的にカバノキ類の生木にカバノアナタケ菌糸を植えこんで増殖させた菌糸、あるいは生木に菌糸を植えこんで菌核を形成させたものも含まれる。これら人工的植菌によるものは、培養物というよりは、むしろ天然産に近いものであって、本発明では天然カバノアナタケに含ませる。

30 【0017】本発明のカバノアナタケ抽出活性成分は、公知のAZTやDDIまたはその他の抗HIV化学製剤と併用することもできる。また、漢方薬系成分と併用または混用し得ることは前述の通りである。さらに、本発明のカバノアナタケ活性成分は、薬として服用するだけでなく、健康食品・健康飲料などとして、例えばコーヒー、緑茶、紅茶、烏龍茶、ビール、牛乳その他の乳飲料、アイスクリームやシャーベットなどの冷菓等々に混合して食または飲用することもでき、またハンバーガーや普通のパン、キャンデー、ガム、食品添加用防腐剤、ペットフード等の食品に混合調理して人間または動物の健康食品とすることもできる。特に、液体培養したカバノアナタケ菌糸の加熱乾燥物は、香ばしい独特な匂いと、軽い苦みがあるからコーヒー、ビールなどに混ぜて飲用すれば、本来の風味を改良しつつ、抗HIV作用をもたらすという新たな効果も発揮することができる。

50 【0018】本発明のカバノアナタケ抽出活性成分は、以上に説明した直接的な抗HIV剤として、または他の

薬剤との併用または混用として、さらには健康食品・健康飲料としての用法のほか、エイズウィルス感染者、エイズ関連症候群患者、あるいはガン患者、さらには健康者のリンパ球を活性化させる種々な分野の用途に広く応用され得るものである。この応用分野のうち、最も期待がもてる4例について以下に説明する。

【0019】第1例は、健全哺乳動物（ヒトを含む）のリンパ球をカバノアナタケ活性成分で活性化し、この活性化リンパ球をHIV感染哺乳動物（ヒトを含む）に投与しエイズ治療に役立てる用法である。エイズウィルスは哺乳動物に感染し、特にヒトのリンパ球を減少させ、死にいたらせる特異な現象を起こすウィルスである。そこで、哺乳動物、特に健全人のリンパ球を採取し、適正な培養条件下でそのリンパ球を培養するときに本発明のカバノアナタケ活性成分に接触させ、リンパ球に刺激を与えてから、このリンパ球をエイズウィルス感染者に投与することによって、エイズウィルス感染者のリンパ球数を確保するとともに、エイズウィルス抵抗性をもたせたリンパ球を感染者に投与することができ、これにより抗HIV作用を高めることができる。必要に応じ、活性成分に接触後のリンパ球から付着している活性成分を分離して、または分離しないでも、用いることができる。

【0020】第2例は、HIV感染哺乳動物（特にヒト）より採血したリンパ球を適正な培養条件下でカバノアナタケ活性成分と接触させることにより、HIV感染リンパ球を死滅させ、健全リンパ球を得て、これを先に採血した感染哺乳動物（ヒトを含む）に再投与することから成る抗HIV療法である。詳説すると、エイズウィルス感染者自身より採血した血液中のリンパ球を適正な培養条件下で本発明のカバノアナタケ活性成分と接触させることにより、HIV感染リンパ球を死滅させるとともに、生き残ったリンパ球を活性化させる。この活性化されたリンパ球を再びHIV患者自身にもどすことにより、患者の体内でエイズウィルスにより減少したリンパ球数を回復させるとともに、エイズウィルスに対して活力のある健全なリンパ球を確保するのである。この方法は、採血した本人のリンパ球を体内にもどすので、親和性が高く、安全な広い応用が期待される。

【0021】第3例は、第1例と同様に、健全なリンパ球を適正な培養条件下で本発明のカバノアナタケ活性成分により活性化して、HIV感染予防に用いる用法である。すなわち、エイズウィルス非感染者のリンパ球（健全リンパ球）を適正培養条件下で培養し、本発明のカバノアナタケ活性成分に接触させることにより、リンパ球は活性化され、ウィルスや細菌に対する抵抗力をつける。こうして活性化された健全リンパ球は、採血者自身を含め、エイズウィルス非感染者に広く投与することができ、これによりHIV感染に対する予防効果を高めることができる。具体的には、例えば身体全体が衰弱した時などにこの健全活性化リンパ球を投与することによ

り、抵抗力・回復力を高めるので、HIVに感染しにくくなり、特に健全活性化リンパ球の投与は、細菌性症状や悪性腫瘍、ガン、エイズ関連症候群を含む種々の病気の発症を抑え、HIVに対する感染予防効果ないし各種病気の抑止効果を発揮するのである。同様にして、カバノアナタケにより活性化したリンパ球の投与法は、ガンの予防または治療にも高い効果を発揮するものと期待される。

【0022】第4例は、研究や治療目的でエイズウィルス感染リンパ球を除去して、非感染リンパ球を得るために本発明のカバノアナタケ活性成分を用いる方法である。すなわち、HIV感染哺乳動物のリンパ球を適正培養条件下で培養し、本発明のカバノアナタケ活性成分と接触させることにより、エイズウィルスと共に感染リンパ球自体を死滅させることができ、死滅したリンパ球を必要に応じ除去して、生き残ったエイズウィルス非感染リンパ球だけを取り出すことができる。非感染リンパ球は研究または治療目的に使用することができる。必要に応じ、リンパ球が2度またはそれ以上カバノアナタケ活性成分と接触するようにしてもよい。

【0023】

【発明の効果】以上のように本発明の抗HIV剤は天然および培養カバノアナタケの抽出物を有効成分とするもので、これは従来ありふれたキノコ類からの抽出物とは本質的に異なって、きわめて低い濃度でもHIV抑止能を発揮するきわめて強力なものであり、しかも生細胞に対する毒性は非常に低いものであるから、エイズの抑制や治療、予防に大なる効力を発揮することが認められる。事実、本発明に係るカバノアナタケ抽出物を1年以上にわたり服用していたエイズ陽性患者から採取した検体からエイズウィルスが分離されなかったことが権威ある機関の検査で明らかになっている。この結果を示すデータを図10に示す。

【0024】また、本発明の抗HIV剤を構成するカバノアナタケ活性成分は、リンパ球を活性化して健全で（非感染）活力のあるリンパ球を与えることができるから、健全者、エイズ感染者、その他の疾病者にこの活性化リンパ球を補給することにより、抵抗力・回復力を高めてエイズの予防および治療に大なる貢献をすることが期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は本発明の抗HIV剤であるカバノアナタケ黒色部分の抽出液（黒丸）、カバノアナタケ培養物抽出液（白丸）と、従来のAZT（黒三角）の種々な濃度（横軸）におけるエイズウィルス巨大細胞形成抑制率（縦軸）を比較して示すグラフである。カバノアナタケ黒色部分及びカバノアナタケ培養物それぞれの抽出固分は、0.1μl/ml 使用した場合、それぞれ350ナノグラムを含んだ溶液濃度である。

【図2】図2は、いずれも本発明の抗HIV剤である天

11

然産カバノアナタケの黒色部分抽出液(黒丸)、オガクズ培養抽出物(白丸)、液体培養菌糸加熱乾燥物(黒四角)、同培養生菌(白三角)、同培養ろ液(黒三角)の種々な濃度(横軸)におけるエイズウイルス感染阻止率(縦軸)を示すグラフである。それぞれの抽出固形分は、 $0.1 \mu\text{l/ml}$ では350ナノグラム含んだ溶液濃度であり、 $1 \mu\text{l/ml}$ では3500ナノグラム含む溶液濃度である。

【図3】図3は本発明のチャガが種々な濃度で非感染系と感染系との細胞生存数(viability)にどのように影響するかを示すグラフで、縦軸は生存率%、横軸は経過日数である。

【図4】図4はチャガの図3と同じ濃度におけるHIV抗原P24の産生量(縦軸)を経過日数(横軸)について示すグラフである。

【図5】図5のグラフAはカバノアナタケでHIVを前処理することの効果を示すグラフで、グラフBはカバノ

12

アナタケで標的細胞を前処理することの効果を示すグラフである。

【図6】図6のグラフAはカバノアナタケで標的細胞を前処理する時間と感染阻止の関係を示すグラフで、グラフBはカバノアナタケで細胞を1時間処理したあと種々の培養時間でカバノアナタケを添加する場合の感染阻止率を示すグラフである。

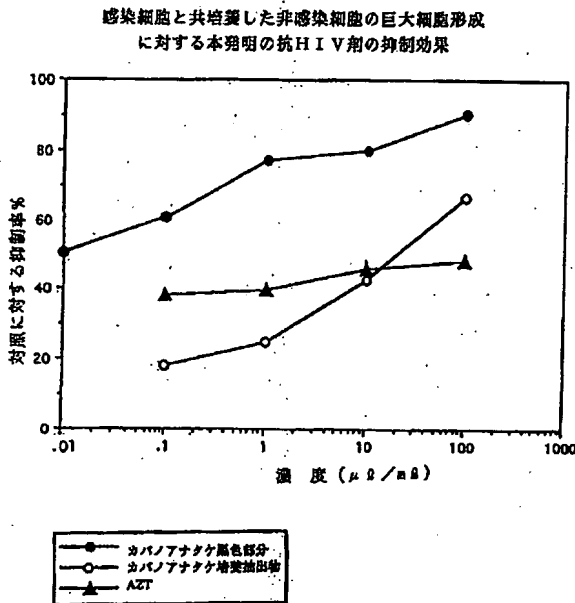
【図7】図7は感染細胞と共培養した非感染細胞の巨大細胞形成に対する本発明の抗HIV剤の抑制効果を示すグラフである。

【図8】図8は本発明の5種類の抗HIV剤の種々な濃度における感染阻止効果を示すグラフである。

【図9】図9は同様に5種類の抗HIV剤の種々な濃度における巨大細胞形成阻止効果を示すグラフである。

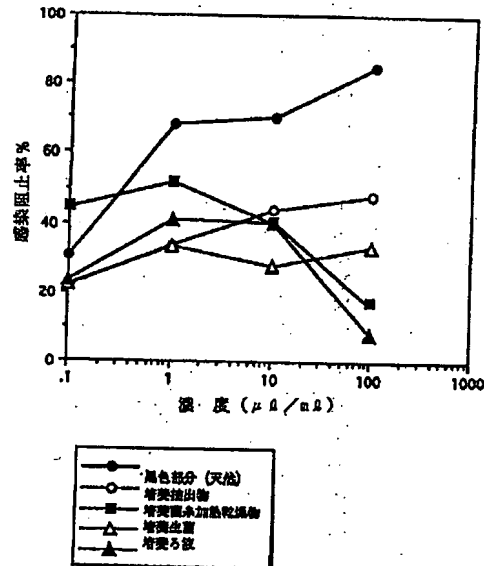
【図10】図10はエイズ検査の結果を示すデータ表である。

【図 1】

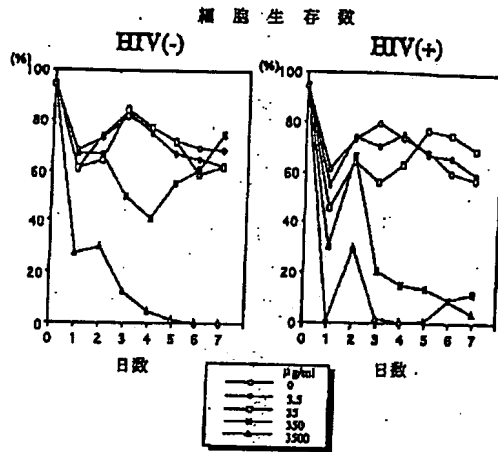


【図 2】

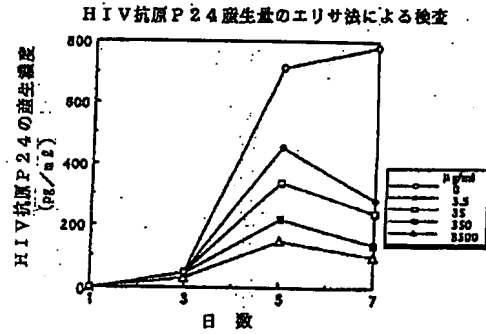
新たにHIVに感染させたPHA刺激淋血単核細胞によるHIV産生に対する本発明の抗HIV剤の阻止効果



【図 3】

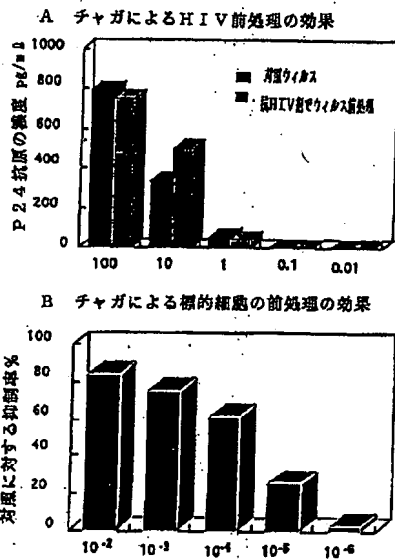


【図 4】



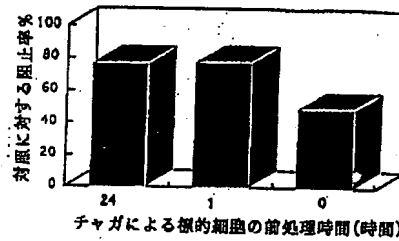
【図 5】

PHA刺激リン血単核細胞の
チャガ前処理による抗HIV作用

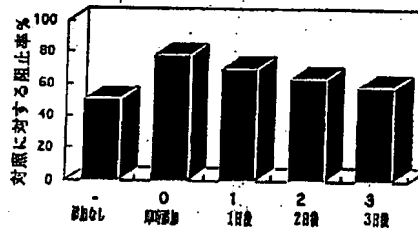


【図 6】

A チャガによる標的細胞の前処理の効果

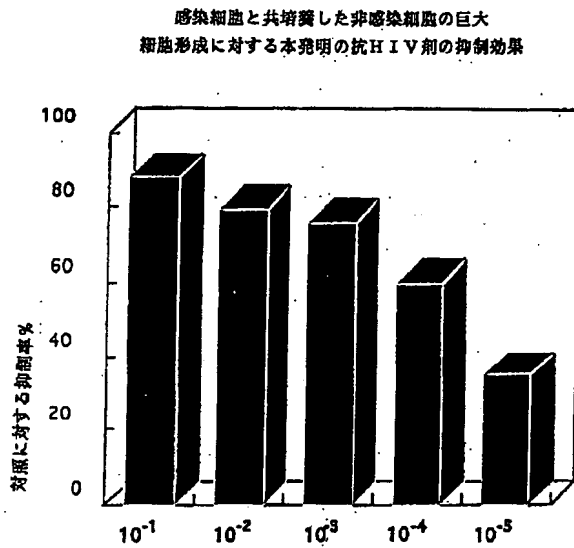


B 標的細胞の抗HIV剤による1時間前処理後の
様々な培養時間におけるチャガ添加の効果



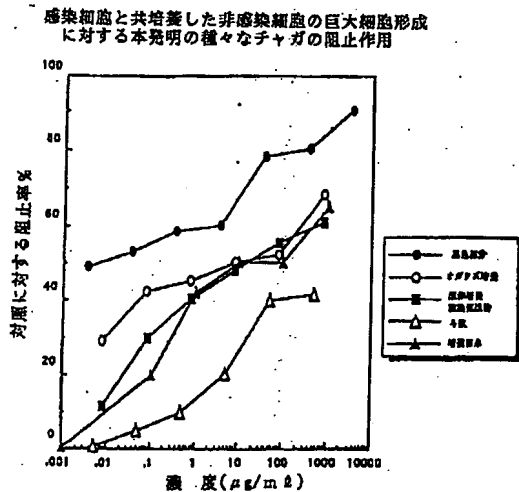
低濃度抗HIV剤はPBS溶液中3.5mg/mlの濃度で調製

【図 7】

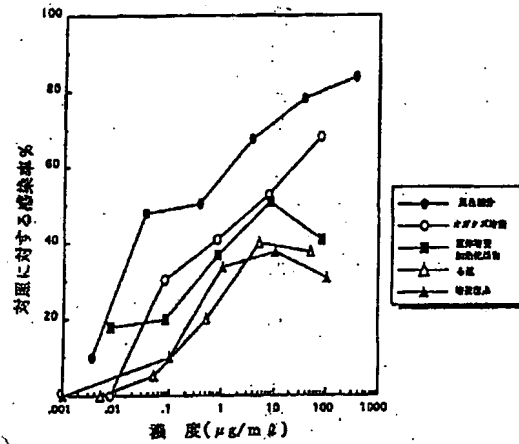


候補抗HIV剤は3.56mg/mlの濃度で調製する

【図 9】



【図 8】



【図 10】

HIV分離の報告

1995年7月18日 報告

試料受領日: 1995.08.14.

(1) 組織培養感染量 (TCID)

総TCID (/ml)	0
細胞TCID (/1x10 ⁶)	0
72hr TCID (/ml)	0
細胞変性効果	

(2) 血清中の抗HIV抗体のウェスタン・ブロット分析

gp180 (env)	gp120 (env)	p65 (pol)	p55 (gag)	p51 (pol)	gp41-43 (env)	p32 (pol)	p24 (gag)	p18 (gag)	p15 (gag)
++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

(3) 宿主レンジ指数

(通信欄) ウイルスは分離されませんでした。

PTO 05-2093 HAMT

Japanese Patent
Document No. 09-191891

ANTI-HIV DRUG

[□□□□□]

Mitsuo Honda; Sakuma Kazuo; Tatsuo Emura;
Nagamichi Yamazaki

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. February 2005

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document]

Unexamined Patent Publication (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application]

Japan Unexamined Patent Publication Hei 9- 191891

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1997 (1997) July 29*

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1997 (1997) July 29*

(54) [Title of the Invention]

ANTI-HIV DRUG

(51) [International Patent Classification, 6th Edition]

C12P 1/02

A61K 35/84 ABD

ADY

// (C12P 1/02

C12R 1:645).

[FI]

C12P 1/02 B

A61K 35/84 ABD A

ADY

[Number of Claims]

18

[Form of Application]

FD

[Number of Pages in Document]

9

[Request for Examination]

Unrequested

(21) [Application Number]

Japan Patent Application Hei 8- 23208

(22) [Application Date]

1996 (1996) January 16*

(71) [Applicant]

[Identification Number]

592142496

[Name]

SAKUMA KAZUO

[Address]

2119-1 Kaminayoro Kamikawagun Shimokawachou (city)Hokkaido

(72) [Inventor]

[Name]

Mitsuo Honda

[Address]

Tokyo Mitaka City Shimorenjaku 2- 5- 11

(72) [Inventor]

[Name]

Sakuma Kazuo

[Address]

2119-1 Kaminayoro Kamikawagun Shimokawachou (city)Hokkaido

(72) [Inventor]

[Name]

Tatsuo Emura

[Address]

4-1-15 3-kenToyohira Toyohira Sapporo City

(72) [Inventor]

[Name]

Nagamichi Yamazaki

[Address]

Tokyo Higashi Yamato City Sayama 3- 1204- 3

(57) [Abstract]

{Objective } To realize a strong anti HIV agent of fungus and especially of Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima origin which ha\ve sufficiently high activitites for HIV even at abnormally low concentrations.

An anti HIV agent which has an active component which is extracted from the natural subsatnce Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima or from a cultured substance using minute quantities of 35 nanograms/ml or more.

A ED50 value is achieved at this minute quantity level.

[Claim(s)]

[Claim 1]

An anti HIV agent which is created by an active component which is extracted from *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima having a strong controlling influence and infection controlling effect for the macro cell formation caused by HIV with concentrations of 35 nanograms/ml.

[Claim 2]

An anti HIV agent which is created by an active component which is extracted from *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima having a strong controlling influence and infection controlling effect for the giant cell formation caused by HIV with concentrations of 350 nanograms/ml.

[Claim 3]

An anti HIV agent which is created by an active component which is extracted from *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima having a strong controlling influence and infection controlling effect for the macro cell formation caused by HIV with concentrations of 3500 nanograms/ml.

[Claim 4]

0

An anti HIV agent which is created by an active component which is extracted from *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima having a strong controlling influence and infection controlling effect for the macro cell formation caused by HIV with concentration levels of more than 01 μ g/ml.

[Claim 5]

An anti HIV agent as in Claim 1 or Claim 4 wherein the extraction is from the black portion of *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima for the above-mentioned active component.

[Claim 6]

An anti HIV agent as in Claim 1 or Claim 4 wherein the

extraction is from the cultured substance of *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima for the above-mentioned active component.

[Claim 7]

An anti HIV agent as in Claim 6 wherein the above-mentioned cultured substance is from a sawdust (?) culture.

[Claim 8]

An anti HIV agent as in Claim 6 wherein the above-mentioned culture substance is from a liquid culture.

[Claim 9]

An anti HIV agent as in Claim 8 where the active component is a substance obtained by thermal drying mycelia which was liquid cultured as mentioned above.

[Claim 10]

An anti HIV agent as in Claim 4 wherein the concentration of the above-mentioned active component is less than $0.1\mu\text{g/ml}$.

[Claim 11]

An anti HIV agent as in Claim 4 wherein the concentration of the above-mentioned active component is more than $1\mu\text{g/ml}$.

[Claim 12]

An anti HIV agent as in Claim 4 wherein the concentration of the above-mentioned active component is more than $10\mu\text{g/ml}$.

[Claim 13]

An anti HIV agent which treats the *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima or *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima culture, with a

PBS, butanol, ethylacetate, or acetone treatment, and has an active component which removes every insoluble matter.

[Claim 14]

An anti HIV agent which treats the absorption of the natural [Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima or [Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima cultured substance with carbon or Thea sinensis L. (tea), and removes every insoluble matter.

[Claim 15]

An HIV anti agent as in Claims 1~4 or Claims 13~14 wherein the agent is jointly used with any or all of a violet root , cinnamon bark or peach kernel as an active component.

[Claim 16]

An HIV anti agent as in Claims 1~4 or Claims 13~14 wherein the agent is jointly used with any or all of coffee , tea , beer , milk or other beverage or bread , hamburger or other foodstuff or health food as an active component.

[Claim 17]

An HIV anti agent as in Claims 1~4 or Claims 13~14 wherein the agent is jointly used with any or all of a violet root , cinnamon bark or peach kernel coffee , tea , beer , milk or other health beverage or bread , hamburger or other foodstuff or health food as an active component.

[Claim 18]

An anti HIV agent which is used by, under appropriate culture conditions, connecting the lymphocytes which were extracted from the healthy mammal or the HIV-infected mammal (includes humans) with any of the active components as in Claims 1~4 or Claims 13~14, activating the healthy lymphocytes and exterminating the HIV-infected lymphocytes.

[Description of the Invention]

[0001]

[Technological Field of Invention]

This invention controls the giant cell formation and infection associated with the AIDS virus (HIV), and relates to an anti HIV agent which has strong preventative activity.

More concretely, this invention is related to an anti HIV agent which has as an active component an extraction from *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima which is used as a strong control using trace amounts against HIV, even among basidiomycetes.

[0002]

[Prior Art]

As AIDS virus (HIV) suppressant , recently, AZT, DDI and other chemistry formulation are known.

But, because there are problems such as adverse reactions and acquired HIV resistance for humans, there have been attempts at using as an anti HIV agent mushroom extract in order to prevent those types of problems.

For example, there is the publicly known example (1) of Japan Unexamined Patent Publication Showa 63-316734, which explored the use of polysaccharide or protein polysaccharide which was extracted from Basidiomycetes "antiviral " as active ingredients, and in addition, 3 kinds of *Ganoderma lucidum* Karst. , *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. , [kikurage] experiments were done as restricted examples of Basidiomycetes.

In addition, there is a Japan Unexamined Patent Publication Hei 2- 134325, publicly known example (2) with the title "AIDS therapeutic agent and its manufacturing method" , that has shown an AIDS therapeutic agent which consists of a component extracted from mycelia culture of Basidiomycetes

Lentinus edodes (shiitake) , [kawara] mushroom, [hira] mushroom, Celtis sinensis Pers. var. japonica (Planch.) Nakai mushroom, [mannen] mushroom and [mai] mushroom are listed as possible Basidiomycetes, publicly known example (2), but the Working Example is limited to just the Lentinus edodes (shiitake) .

[0003]

When you look at these publicly known examples , with the publicly known example (1), a lyophilized product 10mg of extract from Ganoderma lucidum Karst. , Flammulina velutipes (Curt.: Fr.) Sing. , [kikurage] is melted in 100ml distilled water of, using in each case a concentration of 1 mg/ml , and in addition, with the publicly known example (2) the experiment uses the brown powder which is the extracted liquid of Lentinus edodes (shiitake) and the lyophilizing is done with a concentration of 0.10.250.5 mg/ml , but in order to recognize a giant cell formation inhibiting effect, you need 0.5 mg/ml , a relatively high concentration .

Even for those substances that have an anti HIV effect such as Lentinus edodes (shiitake) and Ganoderma lucidum Karst. , Flammulina velutipes (Curt.: Fr.) Sing. , [kikurage] or other extractions from the mycelia of mushroom, and there is evidence that the activity is not high,, as with case 1 of clinical test (clinical test for (9) AIDS patient of Working Example 1) of publicly known example (2). We have assumed the patient with T4 cell 1250/mm ³ recovers to the point that the cell count is 2542, but if it is a seriously ill AIDS patient with a low cell count, (for example, 300 parts/mm³), you call the T4 cell count of 1250 that that patient has as indicative of healing. Conversely, it is concluded that the anti- HIV activity of the active ingredient (Lentinus edodes (shiitake)) is low.

In fact, with case 2 in the same Unexamined Patent Publication, a patient with a cell count 822 patient took an

oral dosage of the *Lentinus edodes* (shiitake) component of in spite accompanying pneumonia , and death resulted.

[0004]

[Problems to be Solved by the Invention]

Considering these background , as for this invention, with Prior Art level vis-a-vis HIV it designates that strong anti-HIV drug of mushroom derivation and the especially [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] derivation which possess fully high degree of activity is actualized as problem even with level of non- normally low concentration which it cannot achieve.

In this invention, [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] natural product and culture are equally effective.

[0005]

[Means for Solving the Problems]

This invention provides an anti HIV agent which controls and inhibits infection against giant cell formation by the AIDS virus using even mushrooms, especially an extract of *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima as the active ingredient.

Because [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima], is classified as Basidiomycetes subphylum in Eumycota , hat microbe sub-tow , crimp pear bamboo eye, tobacco fish scales bamboo course, [sabianatake] being attached, [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] kind {scientific name *Fuscoporia obliqua* (Fr.) Aoshima }, in nature it is found, in natural *Betula tauschii* (white birch), growing in the trunk of Tatsuki of [dakekanba] or other Betulaceae , and forms a black sclerotium whose color is like coal .

The sclerotium has a diameter of 20 cm , originally it was known as a toxic microbe (speaking of cancer), *Betula tauschii* (white birch) or Betulaceae .

But focusing on the life-giving powers where [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] (common name [chaga]) is strong, one of the inventors (Sakuma Kazuo) discovered the fact that it has an effect for which the extract of mycelia controls multiplication of AIDS. Disclosed first in patent application (Japan Patent Application Hei 5-159946) .

These inventors, in cooperation, focused their research and analyzed the anti HIV effects of the chaga extracted fluid, and of course of natural chaga. It was clearly demonstrated that there was a strong anti HIV effect that was confirmed by natural chaga even within the extracted liquid which was obtained by culturing chaga mycelia.

[0006]

The anti HIV effect of the natural chaga extracted liquid, for the black portion derivation on the sclerotium surface, was one level stronger than the non-black (brown) interior portion, and it was recognized that there was 35ng (nanograms) worth of prevention against Fusion (giant cell formation occurred from cell fusion).

In addition, with large cultures, under fixed conditions as a goal, from the results of analyzing with the same methods, the natural chaga extracted liquid that was obtained by sawdust culturing, led to the recognition that an anti HIV effect of 60~70% of the natural chaga was possible.

Furthermore, by thermal drying mycelia which was acquired from liquid culture, and from results obtained by analyzing the infection filament of HIV-BRU (100 TCID 50) which uses the PHA stimulus cell of the normal human peripheral blood mononuclear cell, it became clear that there was an anti HIV effect.

The ED50 for enormous cell control of the above-mentioned natural product was 35 ng/ml (corresponding 0.01 μ l/ml).

Because of these facts that it was demonstrated that there was anti HIV activity in the chaga at extremely low concentrations which were not present for the mushrooms whose results were previously cited in two examples, it is wonderful that there is activity under conditions in which the active ingredient is not isolated.

In addition, it was found and confirmed that there was a synergistic rise for anti HIV agents through the use of chaga extract and Chinese medicine ingredients.

[0007]

This invention is related to 2 formations of growth of so-

called AIDS viruses, that is, to giant cell formations and to infections, and since there was performed an investigation relating to HIV activity using the natural product of *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima, the extract of sawdust culture, the thermal dried product of liquid culture mycelia, culture microbes, culture filtrate, a detailed explanation follows.

test sample 1. [<i>Fuscoporia oblique</i> (Fr.) Aoshima] black portion (natural)
2. [<i>Fuscoporia oblique</i> (Fr.) Aoshima] culture extract (sawdust culture)
3. thermal drying of [<i>Fuscoporia oblique</i> (Fr.) Aoshima] culture mycelia (liquid culture) 4. [<i>Fuscoporia oblique</i> (Fr.) Aoshima] culture microbes (liquid culture) 5. [<i>Fuscoporia oblique</i> (Fr.) Aoshima] culture filtrate (liquid culture)
(1) Giant cell formation control test (Fusion Assay) (Figure 1)

With a ratio of 1:1 for the cell (infected cell) and coculture, by adhesion of the uninfected cell to the periphery of the infected cell, and subsequent fusion, giant cell formation occurs.

This is 1 form of AIDS multiplication.

When [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] black portion (natural) (sample 1) and [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] culture extract (sawdust culture) (sample 2) in this coculture filament are added, a giant cell formation control effect was recognized.

Experimental method: Add to each of the 2 experimental materials 1 and 2 100,10,1,0.1 μ l/ml with Molt4/c18細胞(1×10^6)+Molt4/HIVIIIIB細胞(1×10^6) in each cavity of the 96 cavity microplate. After 24 hrs of culturing, measure the diameter of the cell using a Multisizer.

Those of diameter 20; μ m or greater were regarded as enormous cells , the incidence rate was compared between the two samples.

The results are shown by a graph in Figure 1.

In this graph , the vertical axis is the control rate (%) of giant cell formation, and the abscissa is the concentration (μ l/ml) of the sample .

The control rate for the *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima black portion was demonstrated to be more than double that of AZT.

In addition the [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] culture extract above a concentration of 10 μ l/ml is shown to have a suppression rate superior to AZT.

Furthermore, the [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] black portion (natural product) of this invention , as shown in the graph of Figure 1 , achieves a ED50 for a concentration of 0.01 μ l/ml (corresponding to 35 ng/ml).

[0008]

(2) Infection Prevention Test (Neutralization Assay)
(Figure 2)

As for other forms of AIDS virus growth , viruses spring from a cell with one virus entering a healthy cell. This phenomenon is called infection.,

Using the above-mentioned test samples 1-5 there was an examination as to whether the active ingredient of this invention prevents infection.

Test method: After processing PHA -blast {peripheral blood mononuclear cell of healthy person which is stimulated with PHA (phytohemagglutinin) (PBMC) } (3 X 10⁶) and samples 1-5 at concentrations of 100, 10, 1, 0.1, 0.01 μ l/ml, and at 37 degrees C, HIV-BRU (0.03 cpm /cell) was added and after culturing for 24 hrs., and after washing, the resultant material was cultured for a 5 day period.

After verifying cell survival several (viability), the

HIV antigen (P24 antigen) was measured by the ELISA method , and a comparative investigation was made as for infection prevention capability.

The graph in Figure 2 shows the results.

The vertical axis of this graph is the infection rejection ratio %, and the abscissa is the sample concentration in $\mu\text{l/l}$.

The extract (black circle) of [Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima] black portion (natural) shows a high rejection ratio , and especially above the concentration of $1\mu\text{l /ml}$ (3500 ng/ml) shows a rejection ratio from 70% to 90%.

The culture extract (white circle) is from the sawdust culture.

With the bacterial filaments which were obtained from any of the liquid cultures of the heat dried products of culture bacterial filaments (black square) culture microbes (white triangle), and culture filtered liquid (black triangle), the dried substance (sweet smelling fragrances from other drying methods) were from drying at 105 degrees, and the culture bacteria, after boiling the liquid culture with heated water, were freeze-dried.

thermal drying thing (black square) has shown a relatively high prevention ratio with concentrations of $0.1\mu\text{l /ml}$.

[0009]

Next, [chaga] was investigated for its influence on cell viability .

The results of this examination are shown in two graphs of Figure 3.

The graph of HIV (-) is for the non- infection filament, and the graph for HIV (+) shows the results of the infection filament.

The vertical axis of the graph is the survival %, and the abscissa represents test days .

For this experiment, the chaga extract was used in

concentrations of 0, 3.5, 35, 350, and 3500 μ g/ml, but at a concentration of 3500 μ g/ml, irrespective of filament, whether infectious or non-infectious, the number of living cells was extremely small.

The graph in Figure 4 shows the production of HIV antigen (P24) at the same concentration of the chaga extract (vertical axis is the production concentration [pg/ml], and the abscissa is the number of days), and the low production quantity of HIV antigen P24 is not from the direct anti HIV use of chaga, but from the fact that the infected or not infected cells have died.

Returning to the graph of Figure, the number of living cells for a concentration (black squares) of chaga 350 μ g/ml, is compared to a reference and is reduced, and the great difference in the number of living cells between the infection and non-infection filaments is recognized.

Namely, with the infection filament, it is possible to see a lowering trend over time, but in the non-infection filament, recovery is seen from the 4th day.

With chaga at 350 μ g/ml, there is the possibility of specifically killing infected cells, or in the non-infection filament, it can be presumed that there was a contribution to the activity of the phagocytosis cell.

Chaga at 35 μ g/ml and 3.5 μ g/ml the number of living cells did not greatly differ with the control, and also the viability showed the same trend as the control, and in addition, as shown in the graph of Figure 4, there was satisfactory control of the production of HIV antigen P24.

This was thought to be due to chaga's anti HIV action.

[0010]

Next, there an experiment was performed in order to determine whether or not chaga demonstrates anti HIV action directly on the virus.

In graphs A and graph B of Figure 5 the results of the test are shown, but first, after pretreatment of chaga and virus for two hours, and then ultracentrifuging for 90 minutes at 4500rpm, the chaga was removed.

Infection was caused in PBMC (peripheral blood mononuclear cell) which stimulated the virus using PHA (phytohemagglutinin).

With the results shown in graph A (vertical axis, is concentration of P24 antigen pg/ml, and the horizontal axis represents the concentration), and the contagion is recognized in nearly the same fashion as with the control virus.

In other words, the anti- HIV action of [chaga], was thought not to operate on the virus directly.

Next, after pretreatment for 2 hours of [chaga] and PBMC which was stimulated with PHA, virus infection was completed.

The results as shown in graph B, make clear in the early stages of infection for concentrations in which the viability is comparatively maintained, prevention of the infection is concentration dependent.

[0011]

Furthermore, a investigation of infection prevention was made for three scenarios:for pretreatment of PBMC using chaga which was stimulated with PHA for 24 hours, 1 hour, or not at all.

From the results that are shown in the graph of Figure 6, after the method of graph A(the vertical axis is the prevention rate %, and the horizontal axis is the pretreatment time for the target cells with chaga) performs the respective pretreatment, infection with 100TCID50 HIV virus is done with chaga, and after washing, culturing is done using a culture liquid which includes chaga, and measurements of the HIV antigen P24 which was discharged on the 5th day are taken.

From these results, even with 1 hour's pretreatment, an activity of more than 70% was indicated in the same fashion as when there was a 24 hour pretreatment.

Furthermore, eve when pretreatment was not done, it was clear that the infection was controlled at 50%.

The graph B of Figure 6 shows the results, for after infecting PBMC which was pretreated for 1 hour using the same method, and after infection, of an investigation of infection prevention when chaga is added at the 1st, 2nd, and 3rd day.

From these results, when the time at which chaga is added is delayed, it is clear that infection prevention is somewhat reduced, and even when there is culturing using culture liquid which does not contain chaga, the infection is 60% controlled.

From the above discussion, the chaga active ingredient of this invention is not thought to show an anti HIV effect when an infection has formed.

In addition, it is clear that infection is prevented when pretreatment occurs.

In this way, it is inferred that chaga had some action on the cells.

[0012]

Figure 7 is a graph which shows the results of controlling the Molt4/c 18 cells (uninfected cells) with the anti HIV agent of this invention for giant cell formation when there is coculturing with Molt4/HIV IIIB cells (infected cell)

From these results, it was clear that chaga's control of the formation of giant cells was concentration dependent.

Chaga is thought to significantly contribute to HIV infection introduction

[0013]

Next, referencing Figure 9 (Giant cell formation prevention action) , the invention has as its goal the mass production of chaga's anti HIV activity factors, and the results of attempting a chaga culture under various culture conditions confirm the culture conditions that obtain natural chaga funga even from culture.

Even among those factors, using the extract liquid that was obtained using chaga culture (white circles), the liquid culture (black squares), and the filtered liquid (white triangles), measurements were taken for formation prevention capability towards giant cells.

In Figure 9 these results are shown together with an example (black circle) of natural chaga black color portion.

Figure 9 is a graph which shows the results of investigating the prevention capability of this invention's various anti HIV agents for the formation of giant cells (Syn-cytium Formation) when co culturing Molt4/c18 cells (uninfected cells) and Molt4/HIV IIIB cells (infected cells).

The vertical axis is the rejection ratio %, and the abscissa is the anti HIV drug concentration.

These 5 types of HIV agents (chaga black portion , sawdust culture , liquid culture thermal drying, filtrate , culture mycelia) control, concentration dependently the formation of giant cells types, and with the nature substance, ED50 has already reach in the vicinity of the minute amount of 35 nanograms/ml ($0.001 \mu \text{g/ml}$), and the control rate together with the concentration becomes high rapidly.

In addition, even with the extracted liquid which is acquired with culture 50% or it became clear that there was prevention of the formation of giant cells.

Furthermore, even with filtrate (white triangles), it was clear that there was a 40% control effect.

[0014]

The chaga of this invention, in addition to the natural product, also for the sawdust culture substance and the liquid culture substance has been previously described as having respective anti HIV action there is demonstrated an infection prevention experiment in Figure 8 to show in detail this action (vertical axis, prevention rate %, horizontal axis, anti HIV agent concentration)

The infection prevention experiment using various

concentrations of the 5 types of anti HIV agent as shown in Figure 8 used samples which were used in the experiment to control the formation of giant cells.

From the results, there was infection prevention activity correlated with the ability to prevent the formation of giant cells.

Although not relevant to natural chaga (black circle), even for the extract which was obtained using culture, a corresponding infection prevention activity was recognized.

Especially, using a previously unexpected low concentration for the chaga black portion, for example, even for a concentration approximately $0.01\mu\text{g/ml}$, a 50% prevention rate was cited.

This black portion indicates having a high activity compared to the far lower activity concentrations of such publically known examples of shiitake or *Flammulina velutipes* or varnished conk.

[0015]

An extremely effective anti HIV agent was recognized as the activity ingredient that was extracted from *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima of this invention, but when the active ingredient is jointly used with the medicinal component found in some Chinese medicines, an increased effectiveness is recognized.

For example such medicines as violet root , cinnamon bark , peach kernel , *Pinellia ternata* (*pinellia tuber*), [bukuryou] , [bushi] (Processing) ginseng leaf , *Glycyrrhiza glabra* , *Schizandra chinesis* , [kankyou] (ginger) , small pain, apricot kernel , rhubarb or other Chinese medicine component can be combined or blended with [*Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima] as an active ingredient. Three types, violet root , cinnamon bark , peach kernel have been recognized as being effective in HIV control.

If other bacterial viruses infect human body cells which they have the potential to do, HIV initiates multiplication through self-activation, and it is known that such multiplication can lead to AIDS.

In countering the activation of HIV by this infection mixture, one way is to purify the liver, kidney or other organ from bacterial virus by using violet root, cinnamon bark, peach kernel or other Chinese medicinal ingredients and by combining or mixing with *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima, robust control of AIDS is possible. It is possible to show the effectiveness of *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima as well.

[0016]

The actual extraction of the *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima related to this invention, using various solvents or extraction methods represents a problem.

For example, it is possible to process natural *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima or cultured *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima by means of PBS solution, butanol, ethylacetate or acetone and remove from every insoluble substance the active ingredient.

Absorbance processing of natural *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima or the mycelia component of cultured *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima or mycelia extract by carbon or charcoal can be done, and it is possible also to remove the active ingredient from each non-adsorbent.

In addition, natural *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima or culture *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima active ingredient can be extracted even if boiling (for example 60 min boiling) with water of various pHs.

The extract active ingredients in this invention are recognized as having the stable properties of water solubility, heat resistance, and acid resistance, and all are nearly equal in their effectiveness, and it is recognized that they show an ability to prevent the formation of HIV giant cells and also prevent infections.

Furthermore, referring to this invention, other than the culture from the saw dust culture and the liquid culture that was described above for the *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima in this invention, there is the bacterial filament which is developed by growing *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima of artificial birch or fungus which is developed from living trees.

In this invention artificial inoculations are included in natural *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima with the cultured substance being close to the natural product.

[0017]

The *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima extract active component of this invention can be combined with the publicly available AZT or DDI or other anti HIV chemical formulations.

In addition, Chinese medicinal ingredients can be included as mixed or blended as previously described.

Furthermore, for example coffee , green tea , black tea , crow dragon mixing tea , beer , milk other dairy beverage , ice cream and sherbet or other frozen confection etc. administration can act not only as medicine, but as health food or a health beverage etc, and the *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima], the active ingredient of this invention can also be drunk or added to hamburger or mixed with normal bread, candy , gum , foodstuff addition antiseptic , pet food or other cooked foodstuff and it is also possible to make health food for animals or people.

The thermal drying of the *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima filament which was liquid cultured has a sweet unique odor and as there is a slight bitterness, coffee, beer, etc. may be mixed for drinking, improving the original flavor as well as providing a new anti HIV action which can be demonstrated.

[0018]

The *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima extract active ingredient of this invention can be used as as health food

or as a health beverage as well as for an AIDS virus infected person or an AIDS related syndrome patient or cancer patient. The ingredient is widely applicable in various fields in which the lymphocytes of normal healthy people are active ated as a direct anti HIV drug, explained above, or in combination or blending with other drugs.

Following are 4 examples of fields where the ingredient would be expected to find the best application.

[0019]

The first example activates the lymphocyte of healthy mammal (human included) with the Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima active ingredient and can be administered to an HIV infected mammal (human included) to humans as an AIDS treatment.

\

The AIDS virus infects mammals, and especially in humans, reduces the number of lymphocytes, with death ensuing rapidly.

Here, the lymphocytes of the mammal and especially the healthy person are taken, and under appropriate conditions, when culturing these lymphocytes, contact is made with the Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima active ingredient, and from stimulating the lymphocytes, and by administering these lymphocytes to the AIDS infected person, and together with maintaining the number of the AIDS virus infected person, it is possible to administer to the infected person the lymphocytes that have an AIDS virus resistibility, and consequently, can increase anti HIV action.

According to need, separating the active ingredient which was attached from the lymphocyte after adhesion to the active ingredient or even not separating the ingredient can serve as well.

[0020]

The 2nd example is an HIV treatment which consists of repeated administration to an an infected mammal (human included) who has had blood taken in advance and killing the HIV infected cells and obtaining the healthy lymphocytes by making contact with the Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima active ingredient under appropriate culture conditions.

In detail, under conditions appropriate for making contacting the lymphocytes in the blood taken from the AIDS infected body with this invention's Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima active ingredient, and from this contact killing the HIV infected lymphocytes and activating the living remaining lymphocytes.

By repeatedly returning to the HIV patient's body the activated lymphocytes, within the patient's body, there is a reduction in the infected lymphocytes, and there was confirmation that healthy lymphocytes were active against the AIDS virus.

Because for this method this person's lymphocytes which were from the drawn blood are returned to the body, affinity is high, and safe widespread application is expected.

[0021]

The third example is similar to the first way in that there is an administration method which under proper culture conditions activates the Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima active ingredient of this invention, using healthy lymphocytes for HIV infection prevention.

The lymphocyte (healthy lymphocyte) of the non-infected person is cultured under proper culture conditions and the lymphocyte is activated by having Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima in contact with the infected lymphocytes, creating a resistive force.

In this way, healthy lymphocyte which is activated can include cells within the person whose blood was drawn, making possible a prescription for the AIDS virus to a non-infected person which means creating a preventative effect for HIV infection.

Because concretely, when the body in its entirety has a resistive "restoring force" increased by prescribing this total activity conversion lymphocyte to a healthy person, pathopoiesis of various diseases becomes difficult for HIV, including bacterial disease, malignant tumors, cancer, and AIDS related syndrome, making this technique suitable for HIV prevention or prevention of various diseases.

This administration method of lymphocytes is activated with to similar, with [Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima] and is expected to show high effect even in the prevention or treatment of cancer .

[0022]

The 4th example, with the objective of removing the AIDS virus infected lymphocytes is a method which uses Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima as an active ingredient in order to obtain non-infected lymphocytes.

By culturing the lymphocytes of the HIV infected mammal under proper culturing conditions and then exterminating the AIDS virus lymphocyte by contacting with Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima the active ingredient of this invention, the lymphocyte to be exterminated is removed, thus isolating the AIDS virus non-infected lymphocyte which survives.

Research or treatment for the non-infected lymphocyte can be considered a goal..

According to need, the lymphocyte can be brought into contact with Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima repeatedly.

[0023]

[Effects of the Invention]

As in the above, the anti HIV drug of this invention designates the extract of natural and cultured Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima as the active ingredient and this drug differs from the mushroom extract in that the ingredient shows quite strong HIV control talent even with low concentrations. Because the toxicity for living cells is low, treatment and control for the prevention of AIDS can be effectively shown.

In fact that the AIDS virus was not separated from the study body which had blood drawn from the AIDS positive patient who used for more than one year the Fuscoporia oblique (Fr.) Aoshima extract of this invention was clear from a study by the institute.

Data showing these results is found in Figure 10.

[0024]

In addition, by activating healthy lymphocytes, giving these non-infected lymphocytes vigor by the use of *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima, the active ingredient, it is expected that this treatment contributes significantly to the prevention of AIDS by increasing the resistive force and providing a restoring force for the AIDS infected person as well as for persons with other diseases.

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

[Figure 1]

Figure 1 shows a graph of the extracted liquid of *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima whose black portion is the anti-HIV drug of this invention (black circle) and with the culture extracted liquid (white circle) compares the virus giant cell formation prevention rate (vertical axis) for various concentrations (abscissa) of conventional AIDS treatment (black triangle)

As for Figure 1 extracted liquid of [*Fuscoporia oblique* (Fr.)

The *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima black portion and the cultured *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima extracted solid component, when using 0.1 μ l/ml, is the solution concentration which are solution concentration includes 350 nano grams.

[Figure 2]

Figure 2 shows the black portion extracted liquid of the natural product *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima which in each case which in each case is a anti-HIV drug of this invention (black circle), and be cultured using the additional cultures of sawdust culture extract (white circle), liquid culture mycelia thermal drying ones (black square), same culture microbe (white triangle) as a graph with the AIDS virus infection prevention ratio (vertical axis) for various concentrations (abscissa) of the same culture filtrate (black triangle).

The respective solid components, with 0.1 μ l/ml have solid concentrations which include 350 nano grams, and with 1 μ l/ml, the solution concentration includes 3500 nano grams.

[Figure 3]

Figure 3 shows a graph of the extent of the influence on cell viability by non-infected and infected filmants using various concentrations of the chaga of this invention. The vertical axis is the survival rate %, and the abscissa is elapsed days.

[Figure 4]

Figure 4 is a graph which shows the production quantity (vertical axis) of the HIV antigen P24 for the same concentrations by time elapsed (abscissa).

[Figure 5]

The graph A of Figure 5 is a graph which shows the effect of pretreating HIV with *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima, and graph B shows the effect of pretreating target cells with *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima.

As for graph A of Figure 5 with [*Fuscoporia oblique* (Fr.)

[Figure 6]

Graph A of Figure 6 shows the relationship of infection prevention with time for pretreating the target cells with *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima, and graph B shows the infection prevention rate when *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima is added at various culturing times with a 1 hour pretreatment time for cells using *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima.

[Figure 7]

Figure 7 is a graph which shows the control effect of the anti HIV agent of this invention on the giant target cells of the infected cells which were co-cultured with the infected cells.

[Figure 8]

Figure 8 is a graph which shows the infection prevention effect for various concentrations of the 5 kinds of anti HIV agents of this invention.

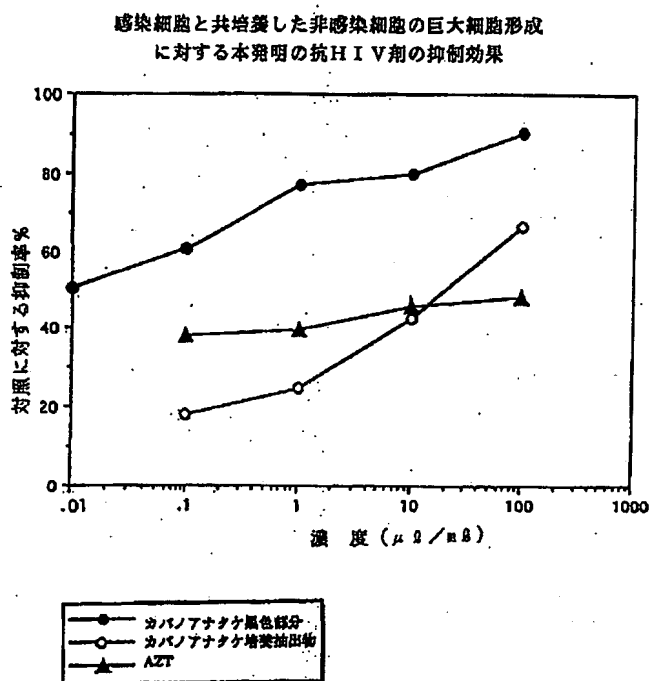
[Figure 9]

Figure 9, in the same way, is a graph which shows giant cell formation prevention effects for various concentrations of the 5 kinds of anti HIV agents

[Figure 10]

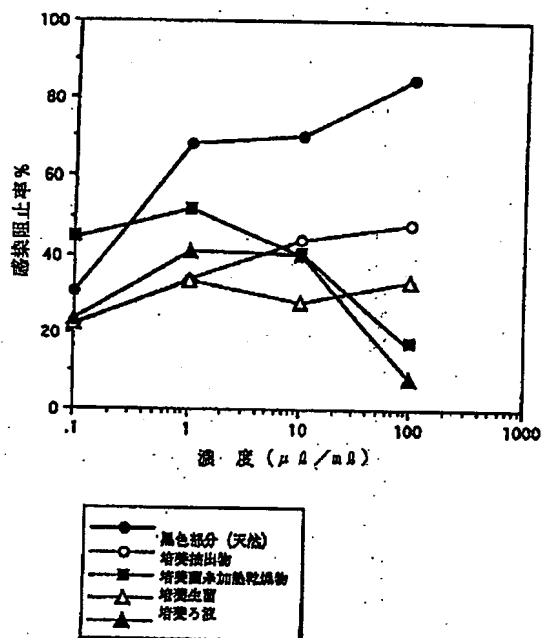
Figure 10 is a data table which shows the results of the AIDS investigation..

【Figure 1】



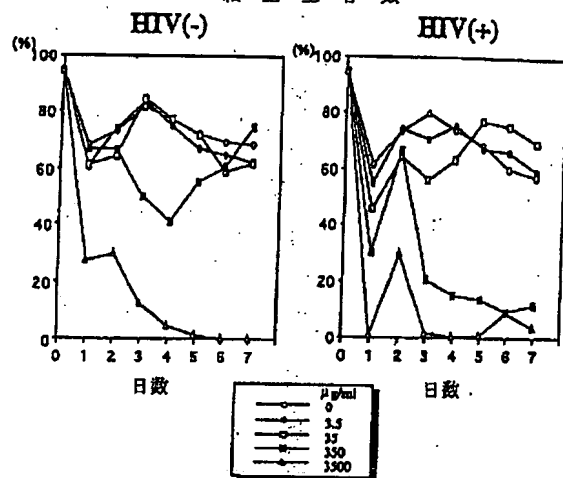
【Figure 2】

新たにHIVに感染させたPHA刺激単核細胞
によるHIV産生に対する本発明の抗HIV剤の阻止効果



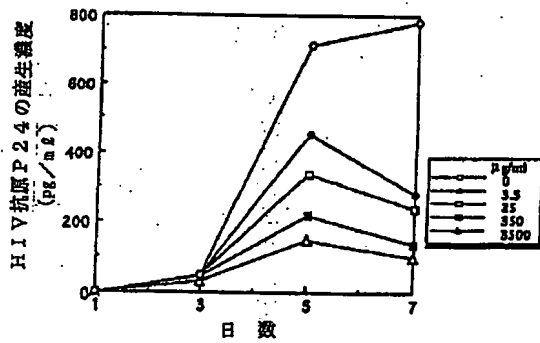
【Figure 3】

細胞生存数



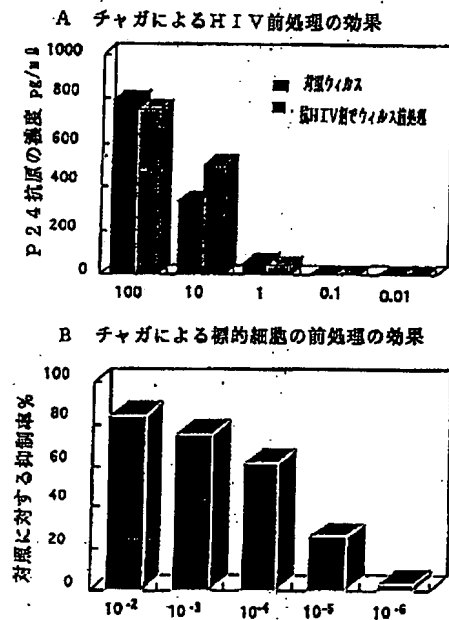
【Figure 4】

HIV抗原P24産生量のエリサ法による検査



【Figure 5】

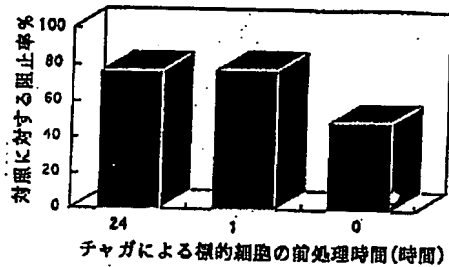
PHA刺激抹消血単核細胞の
チャガ前処理による抗HIV作用



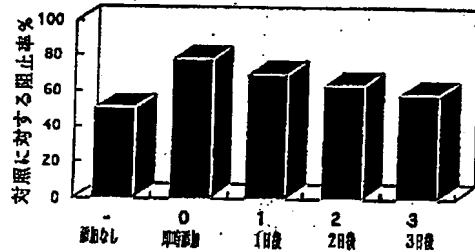
候補抗HIV剤はPBS溶液中3.5mg/mlの濃度で調製

【Figure 6】

A チャガによる標的細胞の前処理の効果

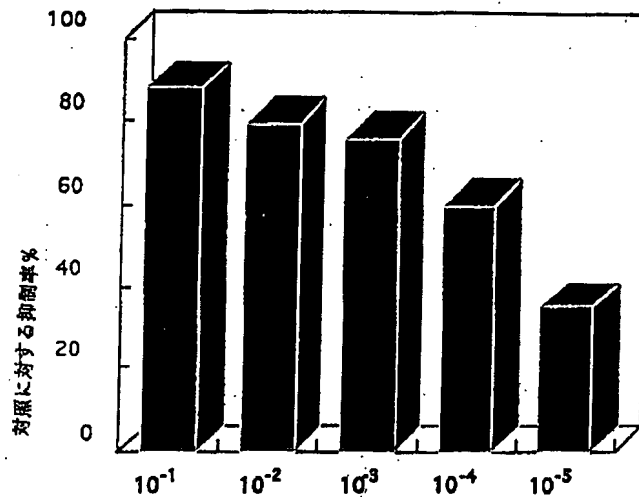


B 標的細胞の抗HIV剤による1時間前処理後の様々な培養時間におけるチャガ添加の効果



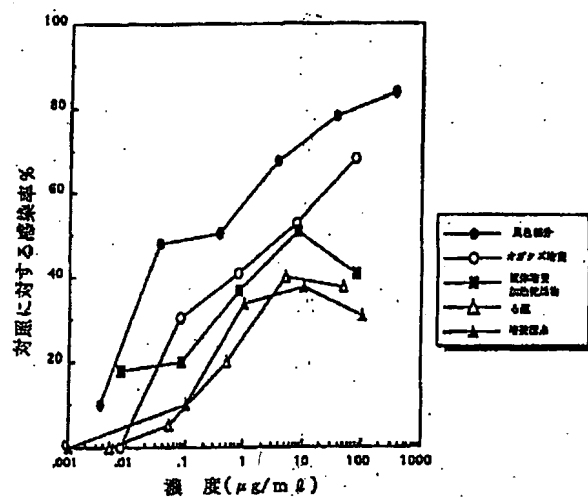
【Figure 7】

感染細胞と共培養した非感染細胞の巨大細胞形成に対する本発明の抗HIV剤の抑制効果



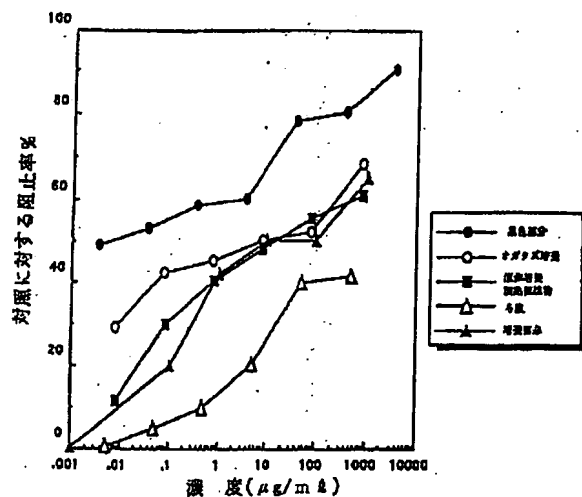
候補抗HIV剤は3.56 μ g/mlの濃度で調製する

【Figure 8】



【Figure 9】

感染細胞と共培養した非感染細胞の巨大細胞形成
に対する本発明の種々なチヤガの阻止作用



【Figure 10】

HIV 分離の報告

1995年7月18日 報告

試料受領日: 1995.08.14、

(1) 組織培養感染量 (TCID)

総TCID (/ml)	0
細胞TCID (/1x10 ⁶)	0
マタTCID (/ml)	0
細胞変性効果	

(2) 血清中の抗HIV抗体のウェスタン・ブロット分析

gp180 (env)	gp120 (env)	p65 (pol)	p55 (gag)	p51 (pol)	gp41-43 (env)	p32 (pol)	p24 (gag)	p18 (gag)	p15 (gag)
++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

(3) 寄主レンジ指数

〈通信観〉ウイルスは分離されませんでした。